

A kén szerepe a növények életében

II. Methionin és glutathion előfordulása a kukorica könnyezési nedvében

N. G. POTAPOV és FEJÉR DOMOKOS

Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest

Első közleményünkben [6] kimutattuk, hogy a növény tápelemei közül a kén jelentőségét sokáig nem ismerték fel, sőt egyenesen alábecsülték. A biokémiai és enzimológiai kutatómunka azonban ma a kénvegyületek, illetőleg a fehérjék kéntartalmú csoportjai szerepét az érdeklődés homlokterébe állította, ezért a növények kéntáplálkozása kérdését is tisztázni szükséges. Intézetünk 1952-ben kezdte a gyökér működésének a növény életében betöltött szerepét tanulmányozni a Szabinyn által kidolgozott [7] könnyeztetési módszerrel. Ezeket az 1952-ben elkezdett vizsgálatainkat eredetileg a nitrogén- és foszforanyagcserének követtetésére végeztük, míg most az 1954-ik évi tenyészidényben a könnyezési nedv elemzése útján a kénanyagcserére is kiterjesztettük.

A kénvegyületekre vonatkozóan közölt irodalmi adatok alapján a fiziológusok körében kialakult az a vélemény, hogy a növényekben csak szulfátok, illetőleg a kénsav észterei alkotják a vándorló kénformákat. Ezt a véleményt fejtik ki Bersin [1] 1950-ben megjelent összefoglaló szemléjében is. Minthogy a könnyezési nedv elemzése során intézetünk munkatársai a szabad aminosavak egész sorát kimutatták, lehetségesnek tartottuk, hogy kéntartalmú aminosavak és peptidek is előfordulhatnak a könnyezési nedvben. Munkahipotézisünk szerint a növény könnyezési nedvében esetleg jelenlevő kéntartalmú aminosavak a gyökér aktív átalakító, szintetizáló működését bizonyítják, egyúttal pedig a vándorló kénformákra vonatkozó ismereteink is bővülnek.

Nem volt kétséges a szulfátok és kénsavészterek jelenléte, ezért figyelmünket elsősorban az ún. „aktív“ kénformák, az organikus kénvegyületek jelenlétének megállapítására és azonosítására fordítottuk. Minthogy az egyes esetleg előforduló anyagok mennyiségének mérését az egyelőre ismeretlen tényezők egész sora befolyásolhatja, és ezek a tényezők a fejlődés egyes fázisaiban nem azonosak, ebben a tenyészidényben kvantitatív adatok elérésére nem törekedtünk.

Tanulmányainkat szabadföldön fejlődő kukoricánövények könnyezési nedvével végeztük. A kukoricát a tenyészidő alatt öt alkalommal könnyeztetettük: először július 7-én, 29 napos korában, vegetatív fejlődési szakaszban, másodszor július 20-án 42 napos, harmadszor július 26-án, 48 napos korában, generatív fejlődési szakaszban, negyedszer augusztus 11-én 64 napos, végül augusztus 23-án, 76 napos korában, érésben.

A könnyezési nedv begyűjtésének általunk is alkalmazott módszerét teljes részletességgel Potapov és Cseh [4] írták le.

Mind az öt alkalommal reggel 6 órakor vágtuk le a növény szárát és a szárcsonk desztillált vízzel való lemosása után a könnyezési nedvet vékony gumi-cső és üvegcső segítségével mérőhengerbe gyűjtöttük. Külön gyűjtöttük össze az első 12 óra (reggel 6-tól este 18 óráig) és a második 12 óra (este 18 órától másnap reggel 6 óráig) folyamán kiszivárgott nedvet. A vizsgálatokat mindig friss könnyezési

nedvvel végeztük; csak teljesen tiszta, meg nem zavarosodott nedvet vizsgáltunk.

A begyűjtött friss könnyezési nedv viszonylag igen híg oldat, átlagos szárazanyag-tartalma 0,4% volt. A híg oldat töményítésével nem érhattünk volna célt, mert a vizsgálatokat zavaró anyagok is ugyanolyan arányban koncentrálnak, mint az általunk keresett kén tartalmú peptidek és aminosavak. Ezért választottuk az ismert és alkalmazható módszerek közül a nehézfémek segítségével történő kicsapás módszerét. Ezzel az oldott alkotórészeknek csak egy hányada válik ki, de a kén tartalmúak legtöbbje igen. Nehézfémként telített merkurinitrát-oldatot használtunk, mint azt Miller és Rockland [3] a citromfélék gyümölcslevében levő cisztein és glutation meghatározásánál leírták.

Ismeretes, hogy a higanyok nem specifikusak a kén tartalmú vegyületekre, más aminosavakkal és egyéb, a növényi anyagok között előforduló termékekkel (pl. kumarin-származékokkal, terpén-származékokkal, stb.) is nehezen oltható csapadékot létesítenek.

Tupaev [8] jóval specifikusabbnak találta szulfhidril-vegyületekkel szemben a kadmiumsók viselkedését, ezért kadmiumnitráttal is megkíséreltük a szulfhidril-származékok leválasztását. A kadmiumnitrátos kezelés a vártnak megfelelően, jóval kevesebb csapadékot szolgáltatott a higany sóval kezelthez viszonyítva, tehát specifikusabb a viselkedése. Ezt a specifikusságra utaló tényt egy másik megfigyelésünk is alátámasztja. Eszerint a főtt kukoricára emlékeztető szagú kukorica könnyezési nedv higanyos kezelés után teljesen elveszítette jellegzetes szagát, tehát higanyal a szagot adó anyag is leválott, míg a kadmiumsós kezelés után a könnyezési nedv eredeti szaga változatlanul megmaradt.

A higanyos és kadmiumsós kezelés hatására mindig több volt az első 12 órában begyűjtött könnyezési nedvből leváló csapadék, mint a második 12 órában begyűjtött nedvből. Ez a megfigyelésünk egyáltalában nem kvantitatív jellegű, de ennek alapján érdemesnek látjuk a gyökér működésének napszakos változásait figyelemmel kísérni a kén tartalmú aminosavakra vonatkozóan is.

A nehézfém-só-oldatok hatására leváló csapadék tisztítása a higany só esetén nem volt nehéz, de a kadmiumsós csapadék tisztítását és a csapadékból a fém leválasztását — amellyel egyidejűleg a leválasztott vegyületek teljes mennyisége felszabadul — nem tudtuk megnyugtatóan megoldani. Ezért specifikusabb jellege ellenére nem a kadmiumsós leválasztás módszerét használtuk.

A higany só alkalmazásával tehát kettős eredményt értünk el: először az igen sokféle aminosavat és más vegyületeket tartalmazó könnyezési nedvből a kén tartalmú vegyületeket viszonylag szelektíven elkülönítettük, másodszor pedig a nagyon híg oldatból kiválasztott csapadékot kevés sósavas vízben szuszpendáltuk, ezáltal a vizsgálandó vegyületek sokkal koncentráltabb oldatát kapjuk. Az ily módon tisztított és koncentrált oldatot kromatografáltuk. A csapadék leválasztásánál és tisztításánál alkalmazott „titrálós” módszerüktől a rendelkezésünkre álló csekély anyagmennyiség miatt el kellett térnünk. Bár módszerünkkel a kén tartalmú származékok szelektívebben elválaszthatók a többi aminosavtól és kísérőanyagoktól, az elkerülhetetlen veszteségek csökkentése érdekében a könnyezési nedv eredeti pH-jára, azaz 5,2-re állítottuk be az oldatot. A megismételt higany sóval történő kezelés után a csapadékot mostuk, kénhidrogénnel elbontottuk, a keresett származékokat tartalmazó oldaton a kénhidrogén elűzése céljából széndioxidot áramoltattunk keresztül, majd az oldatból ismert térfogatnyi mennyiséget szűrőpapírra cseppentettünk.

A vizsgálatokat kb. 22 cm átmérőjű Macherey—Nagel 619 számú kromatográfiás papirossal, körkromatográfiás módszerrel végeztük. Futtató oldószernek 70%-os

etilalkoholt használtunk. A vizsgálandó könnyezési nedven kívül minden esetben egy-egy ismert aminosav törzsoldatából is felcseppentettünk a kromatografiás papírosra. A felcseppentések helye a futtató szolvens felszívását biztosító papírnélv ellenkező oldalán volt: egyik oldalra a minta cseppjét, másikkra az összehasonlító törzsoldat cseppjét tettük. Egyes esetekben metionint és glutationt együttesen tartalmazó törzsoldatokat is használtunk. Futtatás után a kromatogramokat levegőn megszáritottuk, majd vízzel telített butanolban oldott 0,5% ninhidrin oldatával előhívtuk. Minden futtatás alkalmával több párhuzamos kromatogramot állítottunk elő és ezek közül egyet nátriumazid-jódoldatos bepermetezéssel hívtuk elő. A nátriumazidos jódoldattal előhívott kromatogramot analitikai kvarclámpa alatt értékeltük. A nátriumazidos előhívót a következőképpen állítottunk elő: 3 g nátriumazidot, 3 g káliumjodidot és egy apró kristályka szín-jódott oldottunk 10 ml vízben.

A ninhidrinnel előhívott kromatogramokat K a w e r a n [2] módszere szerint tartósítottuk.

Identifikáláshoz mindig a megfelelő tisztaságú gyári készítmény vizes oldata sávjait vettük alapul; metionin Merck P. A., a glutation Hoffmann — La Roche készítmény, a ninhidrin pedig Chinoín gyártmányú volt.

Kísérleti rész

Amint azt Miller és Rockland [3] is megállapították, a glutathion és cistein R_f értékei a felcseppentett nedv savtartalmától függően erősen változnak. Tiszta metioninnal, glutathionnal és ciszteinnel Schleicher et Schüll No 589 fekete szalagos szűrőpapíron — az oldat savtartalmától függően — mi is igen erősen változó R_f értékeket észleltünk, 70%-os etilalkohol futtató szolvens alkalmazá-

I. táblázat

R_f értékek 70%-os etilalkohol futtató szolvenssel

		Macherey-Nagel 619 H			Schleicher-Schüll 589		
I.	Metionin standard ¹	0,65—0,72			0,59—0,86		
	Glutathion standard ²	0,50—0,54			0,36—0,54		
	Cisztein standard	0,33—0,40			0,30—0,59		
II.		GSH	Meth.	CSH	GSH	Meth.	CSH
	1954.						
	VII. 7. kukorica könnyezés ³	0,54	(?)	—	—	—	—
	VII. 20. „	0,53e	0,71	—	0,78	0,44	—
	VII. 26. „	0,52	0,70	—	—	—	—
	VIII. 11. „	0,49	0,67	—	0,73	0,45	—
	VIII. 23. „ 4	—	0,65	—	0,62	0,36—0,43	—

1. Két csoportban 8-8 mérés átlagai: $0,65 \pm 2$ ill. $0,72 \pm 1,5$

2. Két foltban jelentkezik; az alsó elnyúló, halvány foltot nem vettük számításba. Két csoportban végzett 8-8 mérés átlagai: $0,50 \pm 1$ ill. $0,54 \pm 1$

3. A metionin helyén az előhívás után 36 órával ninhidrinnel halvány folt mutatkozik.

4. Sem ninhidrinnel, sem nátriumaziddal nem látható folt; ez utóbbival Ű. V. fényben érzékelhető.

Rövidítések: GSH = redukált glutathion Meth. = metionin
CSH = cisztein e = elnyúló folt.

sakor. A savtartalomnak ezt a hatását a Macherey et Nagel 619 H kromatografiás papíron viszont — a papiros puffertartalma — elég jól visszaszorította (lásd a

táblázatot). Mindazonáltal az R_f értéket azok ingadozása miatt egyedül nem használhattuk fel a foltok identifikálásánál; ismert összehasonlító anyaggal való összehasonlítás és a kétféle előhívó oldat alkalmazásával kapott adatok egyezéséből állapítottuk meg a foltot okozó anyag mibenlétét.

A vizsgálat eredményei és megtárgyalása

Három különböző fejlődési szakaszban levő kukorica könnyezési nedvében öt alkalommal kimutattuk a metionin és a glutation jelenlétét. (L. a táblázatot.) A metionin az első szabad kéntartalmú aminosav, melyet növény könnyezési nedvéből tudomásunk szerint kimutatni sikerült. Cisztein vagy cisztin jelenlétét nem állapítottuk meg, sőt ezek jelenlétére utaló semmiféle észlelésünk sem volt. Jelenlétének tény a glutation előfordulása a kukorica könnyezési nedvében, ami különösen emeli a gyökérnek a növény életében betöltött fiziológiai szerepe jelentőségét.

A glutationnal sikerült a könnyezési nedvben az első tripeptidet is kimutatni, ami egyúttal a legnagyobb molsúlyú vegyület a könnyezési nedv ismert alkotórészei között, minthogy fehérjék kimutatása eddig semmiképpen sem járt eredménnyel. A glutation működésének és a könnyezési nedvben betöltött szerepének tisztázása későbbi feladatunk. Mindenesetre ilyen vonatkozásban is pozitívumnak értékeljük azt a tényt, hogy a glutation fiziológiai-biokémiai működését gátló cisztein jelenléte nem volt kimutatható.

Intézetünk munkatársai közül C s e h [5] vizsgálatának eredménye, mely szerint ugyanebből a könnyezési nedvből készült hidrolizátumban több a glutaminsav mennyisége mint a hidrolizálatlan nedvben, továbbá a hidrolizátumból egy olyan aminosavat, a glicint is sikerült kimutatni, mely a hidrolizálatlan nedvben nem fordult elő, ugyancsak alátámasztja a glutationnak a kukorica könnyezési nedvében való előfordulását bizonyító észlelésünket.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a könnyezési nedv már rövid idő alatt is megváltozik, tehát azonnal, friss állapotban fel kell dolgoznunk. Még jég-szekrényben ($+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ körüli hőmérsékleten) sem marad változatlan; a metionin és a glutation kromatográfiás sávjai az oldat állása folyamán rohamosan gyengülnek. Ennek a jelenségnek az okát nem vizsgáltuk ugyan, de valószínűleg mikroorganizmusok tevékenységére vezethető vissza. Nem tartjuk valószínűnek, hogy a könnyezési nedvnek alkotórészeként, benne előforduló enzimek tevékenységéért bomlának el ezek a kéntartalmú alkotórészek.

Anélkül, hogy vizsgálatainkat befejezettnek tekinthetnők, megállapíthatjuk, hogy az az általánosan elfogadott nézet, hogy csak szulfátok, illetőleg kénsavészterek alkotják a szállítóedények nedvében a mozgékony kénformákat, tovább nem tartható fenn. Még ennél a megállapításnál is jelentősebb azonban a gyökerek szintetikus tevékenységére és a gyökérnek a növény életében betöltött szerepére vonatkozó következtetésünk.

Vizsgálatainkat a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományok Osztálya anyagi támogatása tette lehetővé, amiért ezen a helyen is köszönetünket fejezzük ki.

Összefoglalás

A vegetatív, generatív és érés fejlődési szakaszokban öt alkalommal kukoricáról begyűjtött könnyezési nedvvel végeztünk vizsgálatokat. A könnyezési nedvből merkurinitráttal leválasztottuk a kéntartalmú vegyületeket Miller és R o c k l a n d [3] módszere szerint. A csapadékból kénhidrogénnel felszabadított vegyületek oldatát 70%-os etanol szolvenssel kromatografáltuk és tiszta vegyületek

oldatával észlelt, a táblázatban feltüntetett R_f értékek, valamint ninhidrinnel, illetőleg nátriumazidos jóddoldattal bepermetezve előhívott foltokat metioninnak, illetőleg glutationnal identifikáltuk. Ciszteint nem találtunk a könnyezési nedvben.

A kísérleti adatokból a gyökér szintetizáló működésére következtethetünk és megállapítjuk, hogy a metionin és a glutation is a vándorló kénvegyületek közé tartoznak.

Érkezett : 1955. március 1.

Irodalom

- [1] Bersin, Th. : Adv. Enzymology, **10**. 223. 1950.
- [2] Kaveran, E. : Nature. **163**. 77. 1951.
- [3] Miller, J. M. & Rockland, L. B. : Arch. Biochem. **10**. 416. 1952.
- [4] Potapov, N. G. & Cseh, E. : Ann. Biol. Univ. Hung. **2**. 37. 1952.
- [5] Potapov, N. G. & Cseh, E. : Acta Botanica Hung. **2**. 147. 1955.
- [6] Potapov, N. G. & Fejér, D. : Agrokémia és Talajtan. **5**. 37. 1956.
- [7] Szabinyin, D. A. : Bull. otd. zeml. inszt. agr. No 18. 1928.
- [8] Tupaeu, T. M. : Biohimija. **16**. 611. 1951.

РОЛЬ СЕРЫ В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ II. МЕТИОНИН И ГЛЮТАТИОН В ПАСОКЕ КУКУРУЗЫ

Н. Г. Потапов и Д. Фейер

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Эвеша, Будапешт (Венгрия)

Резюме

Авторы в вегетативной и генеративной фазах, а также в фазу созревания, всего пять раз проводили сбор пасоки кукурузы. Методом Миллера и Рокланда (1950) при помощи нитрата ртути из пасоки выделили серусодержащие соединения. Раствор серусодержащих соединений, освобожденных из осадка сернистым водородом, анализировали методом бумажной хроматографии, применяя в качестве растворителя 70%-ый этиловый спирт. Пятна, проявленные нингидрином, а также иодистым раствором азидата натрия — согласно значениям R_f , приведенным в таблице и полученным хроматографированием растворов соответствующих кристаллических соединений — были идентифицированы как метионин и глютацион. Цистеин обнаружить в пасоке не удалось.

Из полученных данных можно сделать заключение о синтезирующей деятельности корня и установить, что метионин и глютацион принадлежат к числу передвигающихся в растении соединений серы.

Таблица 1.: Значения R_f с 70%-ым этиловым спиртом. 1. Стандартные растворы. 2. Пасока кукурузы.

Sulphur in the Life of Plants

II. The Occurrence of Methionine and Glutathione in the Bleeding Sap of Maize

N. G. POTAPOV and D. FEJÉR

Institute for Plant Physiology, L. Eötvös University, Budapest (Hungary)

Summary

Bleeding sap collected on five occasions in the vegetative, generative, and ripening stages of development was subjected to study. The sulphur containing compounds were separated from it with mercury nitrate applying Miller and Rockland's method [2]. The solution of the compounds liberated from the precipitate by means of hydrogen sulphide were paperchromatographed with a 70 per cent ethanol solvent, and the spots, which were developed by spraying with

ninhydrin or sodium-azide-iodine solution, were identified as methionine and glutathione, respectively. Cysteine was not encountered in the bleeding sap.

Additional evidence for the synthesizing activity of the roots was obtained in the present work.

Table 1. : R_F -values with 70 per cent ethanol. I. Standards II. Bleeding saps of maize.

Die Rolle des Schwefels im Leben der Pflanzen

II. Vorkommen des Methionin und Glutathion im Blutungssaft des Maises

N. G. POTAPOV und D. FEJÉR

Pflanzenphysiologisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest (Ungarn)

Zusammenfassung

Blutungssaft, bei fünf Gelegenheiten während der vegetativen, der generativen und der Reifeperiode eingesammelt, wurde einer Untersuchung unterworfen. Die Schwefel enthaltenden Verbindungen wurden aus den Blutungssäften nach der Methode von Miller und Rockland [2] mittels Mercurinitrats abgeschieden. Die Lösung der aus dem Präzipitat mittels Schwefelwasserstoffs freigemachten Verbindungen wurde mit einem 70 prozentigem Ethanol solvens papierchromatographiert. Die sodann durch Einsprühen mit Ninhydrin, bzw. mit einer Natriumazid-Jodlösung entwickelten Flecken wurden als Methionin, bzw. als Glutathion identifiziert. Die Anwesenheit von Cystein im Blutungssaft konnte nicht festgestellt werden.

Die Verfasser ziehen aus den experimentellen Angaben Schlüsse bezüglich der synthetisierenden Funktion der Wurzel und stellen fest, dass sowohl Methionin als Glutathion zu den wandernden Schwefelverbindungen gehören.

Tabelle 1. R_F -Werte mit 70 %igem Ethylalkohol. I. Standarde. II. Blutungssäfte des Maises